

PENGEKSTRAKAN DAN SIFAT-SIFAT EKSTRAK YIS DARIPADA Candida utilis

RODIAH BINTI MOHD. HASSAN

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2007

PENGKSTRAKAN DAN SIFAT-SIFAT EKSTRAK YIS DARIPADA

Candida utilis

oleh

RODIAH BINTI MOHD. HASSAN

**Tesis yang diserahkan untuk
memenuhi keperluan bagi Ijazah
Sarjana Sains**

Februari 2007

PENGHARGAAN

Bersyukur saya kehadiran Ilahi kerana dengan limpah kurnia-Nya dapat saya menyempurnakan tesis ini. Terlebih dahulu saya ingin menyampaikan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia utama saya iaitu Dr. Rosma Ahmad yang banyak membimbing saya di samping nasihat yang berguna sepanjang saya menyiapkan kajian dan penulisan tesis ini. Selain itu, tidak lupa juga kepada penyelia bersama iaitu Puan Wan Nadiah Wan Abdullah yang juga banyak membantu dan memberi nasihat dalam menyempurnakan tesis ini.

Di samping itu, ucapan terima kasih juga kepada semua pembantu makmal terutamanya Pak Din, En. Asmaizan, Najmah, Mr. Joseph, Amutha serta pembantu-pembantu makmal daripada pusat pengajian lain. Saya juga ingin mengucapkan berbanyak-banyak terima kasih kepada rakan-rakan di makmal mikrob yang sering membantu saya tidak kira susah atau senang iaitu Kuok Ing, Kean Tiek, Wong, Chen Chung, Fiza, Dila dan Mun Wai. Tidak lupa juga rakan-rakan di makmal penyelidikan 2 (MSN) iaitu Kak Biha, Kak Fidah, kak Wa, Akma, Za dan lain-lain yang turut membantu serta rakan seperjuangan lain yang terlibat secara langsung atau tidak langsung. Penghargaan juga saya ucapkan pada teman sebilik, Kak Ita, Na dan Yantie yang setia membantu saya tanpa mengira masa dan tempat.

Seterusnya penghargaan terima kasih saya tujukan kepada tunang tersayang, Amzari Abu Bakar yang banyak membantu, menasihati dan setia bersama ketika susah dan senang. Di samping itu, tidak lupa buat adik beradik saya; abang, kakak dan adik yang menjadi semangat untuk saya berjaya. Akhir sekali, buat emak dan ayah tercinta yang banyak berkorban sepanjang membesarkan saya, jasa kalian akan ku kenang sehingga akhir hayat dan ucapan terima kasih yang tidak terhingga di atas sokongan dan dorongan kalian.

SENARAI KANDUNGAN

Tajuk	Mukasurat
PENGHARGAAN	ii
SENARAI KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI GAMBARFOTO DAN GAMBARAJAH	xiii
SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN	xv
ABSTRAK	xvii
ABSTRACT	xix
BAB SATU: PENGENALAN	
1.1 Latarbelakang kajian	1
1.2 Objektif kajian	6
BAB DUA: TINJAUAN LITERATUR	
2.1 Nanas	
2.1.1 Sisa pertanian nanas dan sumbernya	7
2.1.2 Aplikasi sisa nanas di dalam industri	8
2.1.3 Komposisi kimia sisa nanas	9
2.2 Yis	
2.2.1 Kejadian dan morfologi yis	10
2.2.2 Pembiakan yis	11
2.2.3 Ciri-ciri dinding sel yis	12
2.2.4 Komposisi, struktur dan fungsi dinding sel <i>Candida spp.</i>	13
2.2.5 Kegunaan yis <i>Candida utilis</i> di dalam industri	15

2.2.6	Produk yis dan kebaikannya	16
2.3	Ekstrak yis	
2.3.1	Definisi ekstrak yis	18
2.3.2	Sumber ekstrak yis	18
2.3.3	Aplikasi ekstrak yis di dalam industri	19
2.4	Kaedah pemecahan sel yis	
2.4.1	Autolisis	22
2.4.2	Plasmolisis	24
2.4.3	Hidrolisis berasid	25
2.4.4	Pemvorteks dan bebuli kaca	26
2.4.5	Pengisar bebuli ('bead mill')	28
2.4.6	Penghomogenan	30
2.4.7	Rawatan enzimatik	32
2.5	Faktor pemilihan kaedah pemecahan sel	36
2.6	Sifat-sifat berfungsi protein	37
2.6.1	Keterlarutan	39
2.6.2	Kelikatan	41
2.6.3	Kapasiti pengemulsian	42
2.6.4	Warna	43
2.6.5	Keterbasahan ('wettability')	44
2.6.6	Kekeruhan	45
2.6.7	Ketumpatan pukal	46
2.7	Potensi protein mikrob sebagai makanan berfungsi	48

BAB TIGA: BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Bahan	51
3.2	Pengkulturan <i>Candida utilis</i>	51
3.3	Penyediaan medium agar YEPG	52
3.4	Pengkulturan yis di dalam fermenter	
3.4.1	Penyediaan medium fermentasi daripada sisa nanas	52
3.4.2	Penyediaan inokulum	53
3.4.3	Pengkulturan yis	55
3.5	Pengumpulan dan pencucian sel	56
3.6	Kaedah degradasi sel yis	57
3.6.1	Degradasi sel secara mekanikal	59
3.6.2	Degradasi sel dengan enzim individu tanpa bebuli kaca	59
3.6.3	Degradasi sel secara enzim individu bersama bebuli kaca	60
3.6.4	Degradasi sel oleh dua enzim bersama bebuli kaca	
3.6.4.1	Penambahan kombinasi enzim secara serentak	61
3.6.4.2	Penambahan kombinasi enzim secara berturutan	62
3.7	Penentuan analisis	
3.7.1	Penentuan peratusan yis yang tidak pecah	64
3.7.2	Penentuan kandungan protein terlarut (kaedah Folin-Ciocalteu/Lowry)	65
3.7.3	Penentuan jumlah pepejal larut	65
3.8	Mikroskop Transmisi Elektron	
3.8.1	Penyediaan sampel	66
3.8.2	Pemotongan dan perwarnaannya sel	68
3.9	Penghasilan ekstrak yis (YE)	69

3.10	Komposisi kimia ekstrak yis	70
3.10.1	Penentuan lembapan (kaedah pengeringan)	70
3.10.2	Penentuan abu total	71
3.10.3	Penentuan protein kasar (kaedah Kjeldahl)	72
3.10.4	Penentuan kandungan asid amino dengan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC)	73
3.10.4.1	Penyediaan sampel	74
3.10.4.2	Penyediaan piawai asid amino	75
3.10.5	Penentuan kandungan vitamin B kompleks dengan HPLC	75
3.10.6	Penentuan kandungan ribonukleotida dengan HPLC	76
3.11	Sifat-sifat berfungsi Ekstrak yis	
3.11.1	Keterlarutan	77
3.11.2	Kelikatan	78
3.11.3	Kekeruhan	78
3.11.4	Warna	78
3.11.5	Ketumpatan pukal	79
3.11.6	Kapasiti pengemulsian	79
3.11.7	Keterbasahan	80
3.12	Analisis statistik	81

BAB EMPAT: KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

4.1	Kesan kaedah degradasi sel yis <i>Candida utilis</i>	82
4.1.1	Kesan degradasi sel secara mekanikal	83
4.1.2	Kesan degradasi sel menggunakan enzim individu tanpa bebuli kaca	89
4.1.3	Kesan degradasi sel secara enzim individu	95

	bersama bebuli kaca	
4.1.4	Kesan kaedah rawatan kombinasi enzim bersama bebuli kaca	103
4.1.4.1	Kesan penambahan kombinasi enzim secara Bersama bebuli kaca	104
4.1.4.2	Kesan penambahan kombinasi enzim secara berturutan bersama bebuli kaca	109
4.1.5	Perbincangan umum bagi keseluruhan kaedah rawatan	116
4.1.6	Kesan kaedah terbaik untuk degradasi struktur sel yis	124
4.2	Komposisi kimia ekstrak yis	
4.2.1	Kandungan lembapan (kaedah pengeringan)	132
4.2.2	Kandungan abu	132
4.2.3	Kandungan protein kasar (kaedah Kjeldahl)	133
4.2.4	Kandungan asid amino	136
4.2.5	Kandungan vitamin B kompleks	143
4.2.6	Kandungan ribonukleotida	145
4.3	Sifat-sifat berfungsi ekstrak yis	
4.3.1	Keterlarutan	147
4.3.2	Kelikatan	149
4.3.3	Kekeruhan	150
4.3.4	Warna	152
4.3.5	Ketumpatan pukal	154
4.3.6	Kapasiti pengemulsian	155
4.3.7	Keterbasahan	157

BAB LIMA: KESIMPULAN DAN CADANGAN LANJUTAN

5.1	Kesimpulan	161
5.2	Cadangan lanjutan	164
RUJUKAN		166
LAMPIRAN		192
SENARAI PENERBITAN		201

SENARAI JADUAL

		Muka surat
Jadual 2.1	Komposisi kimia sisa perkilangan nanas	9
Jadual 2.2	Sifat-sifat berfungsi protein apabila protein berinteraksi dengan unsur-unsur makanan yang berbeza	39
Jadual 3.1	Kadar aliran gradien bagi analisis asid amino menggunakan HPLC	74
Jadual 4.1	Rumusan keputusan analisis untuk setiap kaedah rawatan degradasi sel	123
Jadual 4.2	Profil asid amino YE kajian dibandingkan dengan sampel-sampel rujukan (g/100g sampel asas kering)	141
Jadual 4.3	Kandungan vitamin-B dalam YE kajian dan sampel rujukan	144
Jadual 4.4	Kandungan 5'-ribonukleotida dalam YE kajian dan sampel rujukan	146
Jadual 4.5	Keputusan sifat-sifat berfungsi YE kajian yang diperolehi melalui kaedah degradasi terbaik berbanding sampel-sampel rujukan	160

SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 2.1	Skema struktur pertunasan sel yis	11
Rajah 2.2	Ilustrasi komponen dinding sel yis	15
Rajah 2.3	Teknik-teknik yang sesuai untuk pemecahan mikroorganisma pada skala besar	22
Rajah 2.4	Pengisar bebuli dengan bekas pengisar melintang	30
Rajah 2.5	Skema gambar homogenizer bertekanan tinggi	32
Rajah 4.1	Kesan rawatan secara mekanikal terhadap kandungan protein	84
Rajah 4.2	Kesan rawatan secara mekanikal terhadap jumlah pepejal terlarut	87
Rajah 4.3	Kesan rawatan secara mekanikal terhadap peratusan sel sempurna	88
Rajah 4.4	Kesan degradasi sel dengan enzim individu tanpa bebuli kaca terhadap kandungan protein	91
Rajah 4.5	Kesan degradasi sel dengan enzim individu tanpa bebuli kaca terhadap jumlah pepejal terlarut	93
Rajah 4.6	Kesan degradasi sel dengan enzim individu tanpa bebuli kaca terhadap jumlah peratusan sel sempurna	95
Rajah 4.7	Kesan degradasi sel secara enzim individu bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap kandungan protein	98
Rajah 4.8	Kesan degradasi sel secara enzim individu bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap jumlah pepejal terlarut	100
Rajah 4.9	Kesan degradasi sel secara enzim individu bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap peratusan sel sempurna	103
Rajah 4.10	Kesan penambahan kombinasi enzim secara serentak bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap kandungan protein	105

Rajah 4.11	Kesan penambahan kombinasi enzim secara serentak bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap jumlah pepejal terlarut	107
Rajah 4.12	Kesan penambahan kombinasi enzim secara serentak bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap peratusan sel sempurna	109
Rajah 4.13	Kesan penambahan kombinasi enzim secara berturutan bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap kandungan protein	112
Rajah 4.14	Kesan penambahan kombinasi enzim secara berturutan bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap jumlah pepejal terlarut	114
Rajah 4.15	Kesan penambahan kombinasi enzim secara berturutan bersama bebuli kaca (diameter: 0.25-0.65 mm, 5 g (b/b)) terhadap peratusan sel sempurna	116
Rajah 4.16	Kandungan abu, kelembapan dan protein Kjeldahl dalam sampel YE kajian dan sampel-sampel rujukan.	135
Rajah 4.17	Profil penjelasan kuantitatif untuk kandungan asid amino yang mempunyai sifat perisa dalam sampel YE kajian dan sampel-sampel rujukan	142

SENARAI GAMBARFOTO DAN GAMBARAJAH

		Muka surat
Gambarfoto 3.1	Sisa nanas yang telah dicuci dan di potong kecil (1-2 cm)	54
Gambarfoto 3.2	Sisa nanas di dalam air suling pada nisbah 1:1 selepas diautoklaf selama 15 minit pada suhu 121 °C di bawah tekanan 15 p. s. i.	55
Gambarfoto 3.3	Fermentasi yis di dalam fermenter 2.0 L pada suhu 30 °C selama 30 jam dengan kelajuan pengaduk ditetapkan pada 775 psm	56
Gambarfoto 3.4	Pencampuran sebanyak 6 mL (40 % (b/i)) sel yis dan 5 g (b/b) bebuli kaca di dalam kelalang kon 50 mL sebelum kaedah degradasi dilakukan	58
Gambarfoto 4.1	Serbuk yis ekstrak kajian selepas pengeringan sejuk-beku.	125
Gambarfoto 4.2	Sampel kajian dan sampel rujukan yang dicairkan sebanyak 2 % (b/i) di dalam air suling untuk penentuan kekeruhan dan kelikatan yang mana (a) telur putih (b) wei protein (c) YE Maxarome (d) YE Gistex (e) YE medium (f) YE kajian.	152
Gambarajah 2.1	Pertunasan sel yis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	12
Gambarajah 4.1	Pemerhatian sel di bawah mikroskop cahaya terhadap yis yang belum dilakukan sebarang kaedah pendegradasian pada kuasa pembesaran 1000X	127
Gambarajah 4.2	Pemerhatian sel di bawah mikroskop cahaya pada kuasa pembesaran 1000X terhadap yis yang telah dilakukan kaedah pendegradasian melalui kaedah yang terbaik menggunakan 0.5 % selulase dengan penggoncangan bersama bebuli kaca selama 18 jam.	127

Gambarajah 4.3	Pemerhatian struktur sel yis <i>Candida utilis</i> sebelum dilakukan sebarang proses pendegradasian menggunakan mikroskop transmisi elektron.	130
Gambarajah 4.4	Pemerhatian struktur sel yis <i>Candida utilis</i> menggunakan mikroskop transmisi elektron setelah dilakukan proses pendegradasian yang terbaik menggunakan 0.5 % selulase dengan penggoncangan bersama bebuli kaca selama 18 jam.	130
Gambarajah 4.5	Pemerhatian struktur sel yis <i>Candida utilis</i> menggunakan mikroskop transmisi elektron setelah dilakukan proses pendegradasian yang terbaik menggunakan 0.5 % selulase dengan penggoncangan bersama bebuli kaca selama 18 jam.	131

SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN

Singkatan	Definisi
ADI	Pengambilan seharian yang dibenarkan (Admissible daily intake)
AMP	Adenosin monofosfat (Adenosine monophosphate)
ANOVA	Analisis kepelbagaian (Analysis of variance)
b/i	Berat per isipadu
b/b	Berat per berat
BSA	Albumin serum bovin (Bovine serum albumin)
CMC	Karboksimetil selulosa (Carboxymethyl cellulose)
FAO	Food and Agricultural Organization
FDA	Food and Drug Administration
GMP	Guanosin monofosfat (Guanosine monophosphate)
GRAS	Umumnya dikenali sebagai selamat (Generally recognize as safe)
HPLC	Kromatografi cecair berprestasi tinggi (High performance liquid chromatography)
i/i	Isipadu per isipadu
IMP	Inosin monofosfat (Inosine monophosphate)
pI	Titik isoelektrik (isoelectric point)
psm	Putaran seminit
SD	Sisihan piawai (Standard deviation)
TEM	Mikroskop transmisi elektron (Transmission electron microscope)
UV	Ultra ungu (ultra-violet)
YE	Ekstrak yis (Yeast extract)
YEPG	Ekstrak yis-pepton-glukosa (Yeast extract, peptone, glucose)

Simbol	Definisi
β	Beta
α	Alfa
%	Peratus
$^{\circ}\text{C}$	Darjah Celsius
θ	Teta

PENGKSTRAKAN DAN SIFAT-SIFAT EKSTRAK YIS DARIPADA

Candida utilis

ABSTRAK

Kesan pengolahan enzimatik dan pemecahan mekanikal secara individu atau gabungan ke atas yil penghasilan ekstrak yis daripada *Candida utilis* telah dikaji untuk mendapatkan proses yang optimum kerana ekstrak yis sangat berpotensi sebagai penambahbaik perisa dalam industri makanan. Pertumbuhan dilakukan di dalam 1500 mL jus sisa nanas pada pH 4.5 yang ditetapkan suhu 30 °C , 775 psm adukan, kadar pengudaraan 2 L/min selama 30 jam di dalam fermenter 2.0 L. Kaedah pengekstrakan enzimatik, melibatkan enzim protease (Neutrase 1.5 MG) dan selulase (Celluclast 1.5l FG) dengan kepekatan 0.5 % dan 1.0 % (b/i) sedangkan kaedah mekanikal melibatkan penambahan 5 g (b/b) bebuli kaca berdiameter 0.25 mm-0.65 mm ke dalam campuran 40 % (b/i) sel yis. Pengekstrakan dilakukan di dalam inkubator bergoncang bersuhu 50 °C dengan goncangan 250 psm selama 24-42 jam. Persampelan dilakukan setiap selang 2-6 jam untuk penentuan jumlah peratusan sel pecah, jumlah pepejal terlarut dan protein terlarut. Kaedah pengekstrakan enzimatik menggunakan selulase (0.5 %) digoncang bersama bebuli kaca selama 18 jam merupakan kaedah terbaik dengan 90.1 % sel telah pecah menghasilkan protein terlarut dan jumlah pepejal terlarut masing-masing 11.4 % (b/b) dan 5.3 % dengan produktiviti protein sebanyak 0.6 g/jam. Larutan ekstrak yis dikeringkan menjadi serbuk menggunakan kaedah pengeringan sejuk beku. Penentuan komposisi kimia dan sifat-sifat berfungsi telah dilakukan dan keputusan memperlihatkan bahawa ekstrak yis (YE) kajian

mempunyai lembapan tertinggi yaitu 20.1 % tetapi rendah kandungan abu (5.5 %, asas kering) dan protein Kjeldahl (49.6 %, asas kering) berbanding YE komersial (Maxarome®, Gistex® dan YE untuk medium mikrobiologi). Kandungan asid amino total dan perlu YE kajian adalah yang paling rendah iaitu masing-masing 13.4 g/100 g dan 5.5 g/100 g jika dibandingkan dengan YE komersial. YE kajian mempunyai perisa pahit yang lebih menonjol berbanding perisa-perisa lain (manis, mirip-MSG dan tidak berperisa). Walaubagaimanapun perisa pahit tersebut adalah paling rendah jika dibandingkan dengan YE komersial. YE kajian mempunyai kandungan ribonukleotida IMP (1.7 mg/g) dan GMP (0.9 mg/g) yang hampir menyerupai YE Gistex® serta kandungan niasin, piridoksin dan riboflavin masing-masing 12.52, 0.09 dan 0.07 g/100 g. Kajian juga menghasilkan YE yang mempunyai sifat keterlarutan, kelikatan, kapasiti pengemulsian, ketumpatan pukal dan warna yang baik serta sebanding dengan ekstrak-ekstrak yis komersial dan sekaligus menjadikan YE kajian sangat berpotensi digunakan dalam sistem makanan.

EXTRACTION AND PROPERTIES OF YEAST EXTRACT FROM *Candida utilis*

ABSTRACT

The effects of enzymatic treatment and mechanical rupture carried out individually or in combination on the yield of yeast extract production from *Candida utilis* were studied in an attempt to obtain an optimum extraction process due to great potential of yeast extract as flavour enhancer in food industries. *Candida utilis* was cultured in 1500 mL pineapple waste medium in a 2.0 L benchtop fermentor for 30 h at 30 °C with agitation speed and aeration rate at 775 rpm and 2 L/min, respectively. In the enzymatic treatment, protease (Neutrase 1.5MG) and cellulase (Celluclast 1.5I FG) at two concentrations (0.5 % and 1.0 %, w/v) were used while for mechanical rupture, 5 g of glassbeads (0.25-0.65 mm) were added into 40 % (w/v) suspension of yeast cells. The extraction processes were carried out at 50 °C, 250 rpm for 24-42 h in an incubator shaker and samples were taken at 2-6 h intervals and analyzed for the percent of disrupted cells, total soluble proteins and solids. Optimum extraction was obtained from the enzymatic treatment using cellulase (0.5 %, w/v) aided with glassbeads for 18 h. The process resulted in higher soluble protein and solids, reaching 11.4 % (w/v) and 5.3 %, respectively with 90.1 % cells disrupted and the protein yield was 0.6 g/ L. The soluble extract was freeze-dried for characterization of chemical compositions and functional properties. The yeast extract in this study showed a high moisture content of 20.1 %, and thus low in Kjeldahl protein and ash content which were 39.6 % (dry weight) and 4.4 % (dry weight), respectively compared to the commercial

yeast extracts (Maxarome®, Gistex® and yeast extract for microbiological media). The total and essential amino acids were 13.4 g/100 g and 5 g/100 g, respectively and were comparatively lower than the commercial yeast extracts. The yeast extract studied was found to have a prominent bitter taste compared to other flavours (sweet, MSG-like and no taste). However, the bitter taste was still the lowest if compared to the commercial yeast extracts. Contents of ribonucleotides, IMP (1.7 mg/g) and GMP (0.9 mg/g) were similar to that of Gistex® yeast extract while niacin, pyridoxine and riboflavine were 12.5, 0.09 and 0.07 g/ 100 g, respectively. The functional properties of the yeast extract in this study are comparable with those of commercial yeast extract which were indicated very good solubility, viscosity, emulsifying capacity, bulk density, colour and have good potential for application in food systems.

BAB SATU

PENGENALAN

1.1 Latarbelakang kajian

Di Malaysia nanas merupakan tanaman buah-buahan yang penting dan diberi keutamaan. Pada tahun 1994, kawasan tanaman nanas proses dianggarkan seluas 7 730 hektar, iaitu 35 % ditanam oleh pekebun kecil dan bakinya ditanam di estet-estet. Hampir keseluruhan kawasan ini terdapat di negeri Johor. Anggaran pengeluaran adalah sebanyak 160 000 tan setahun (Anon, 2006). Sebanyak 20 % daripada berat sebiji nanas digunakan untuk industri pengkalengan buah nanas, manakala selainnya dalam bentuk kulit dan empulur dibuang sebagai sisa (Hutagalung, 2002).

Sisa perkilangan nanas adalah sumber berpotensi bagi gula, vitamin dan faktor pertumbuhan yang boleh digunakan sebagai substrat untuk pengeluaran etanol dan boleh mengurangkan kos perlupusan sisa (Chye dan Meng, 1975; Prior *et al.*, 1980; Alain *et al.*, 1987) kerana kilang-kilang adalah dikehendaki untuk merawat sisa-sisa kilang mereka sebelum dilupuskan dalam usaha untuk mengurangkan muatan organik. Menurut Nigam (1999), sisa nanas mengandungi jumlah gula total yang tinggi (81.3-83.4 g/L) dan kandungan gula penurunnya di antara 38.2 dan 40.1 g/L. Unsur-unsur gula yang utama adalah sukrosa, glukosa dan fruktosa. Selain itu, Joseph dan Mahadeviah (1998) melaporkan bahawa, beberapa produk seperti bromelain, wain, sirap gula, asid sitrik dan makanan haiwan ternakan boleh dihasilkan daripada sisa industri pemprosesan jus nanas.

Dalam pada itu, yis telah digunakan dalam pengeluaran makanan seperti pembuatan bir, wain dan pembuatan roti (AFLN, 1997). Kebanyakan makanan berasaskan yis menggunakan strain *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces carlsbergensis* kerana kajian menunjukkan keputusan yang memuaskan untuk ketiga-tiga strain tersebut. Namun begitu, *Candida utilis* merupakan strain yis yang digemari kerana mempunyai saiz sel yang besar yang mana yis ini dapat membiak dengan cepat di bawah keadaan aerobik dan menggunakan ammonia dengan berkesan untuk mensintesis kesemua asid amino perlu. *Candida utilis* menggunakan pelbagai jenis monosakarida dan disakarida berbanding spesies-spesies yang lain dan ini bermakna hasil yis per berat karbohidrat yang lebih tinggi dan menjadikan *Candida utilis* yang tertinggi di antara ketiga-tiga jenis yis yang diterima tersebut yang mana kandungan protein melebihi 68 %. *Candida utilis* adalah bahan permula yang digemari kerana strain tersebut umumnya dikenali sebagai selamat (GRAS) oleh FDA untuk kegunaan produk makanan (Maltz, 1981).

Ekstrak yis telah digunakan sebagai agen perasa di dalam sup, sos, gravi, 'stew', makanan ringan dan makanan dalam tin. Selain itu, kegunaan lain termasuklah vitamin tambahan dalam makanan kesihatan dan juga sebagai sumber nutrien dalam media mikrobiologi. Ekstrak yis mengandungi 5'-inosina monofosfat yang mempunyai kepentingan untuk meningkatkan ciri-ciri penambahbaik perisa (York dan Ingram, 1996). Malah, ekstrak yis dan autolisat juga tergolong sebagai perisa makanan dalam penyediaan produk

daging seperti sosej, ham, isian pai daging dan sebagainya. Ekstrak yis dan autolisat juga tidak hanya meningkatkan profil perisa makanan tetapi berpotensi untuk mengurangkan ekstrak daging yang mahal (Peppler, 1982; Dziezak, 1978). Selain itu, ekstrak yis juga boleh digunakan sebagai ramuan tambahan untuk meningkatkan perisa 'savoury' bagi keju, ham, bawang, rempah dan sebagainya (Lyall, 1965)

Dalam pada itu, bahagian yang terpenting dalam pemprosesan ekstrak yis untuk industri makanan adalah memecahkan dinding sel. Oleh itu, dalam proses pemecahan dinding sel, terdapat beberapa perkara yang perlu dititikberatkan. Pengetahuan struktur dinding sel adalah penting dalam pemilihan kaedah pemecahan dan rasionalnya parameter pemecahan untuk disesuaikan dengan sifat pemakanan sel itu sendiri (Middelberg, 1995). Walaubagaimanapun, keaslian dinding sel bakteria atau yis adalah bergantung kepada jenis organisma, terutamanya keadaan pertumbuhan luaran seperti suhu pembiakan, kehadiran bahan kimia tertentu dalam persekitaran, kandungan medium pertumbuhan, fasa pertumbuhan atau kadar pertumbuhan spesifik (Sutherland, 1975; Engler & Robinson, 1981; Engler, 1985; Coillis *et al.*, 1995).

Menurut Anon (2004a), sel yis boleh dipecahkan dengan menggunakan kaedah mekanikal atau terpecah apabila dibiarkan terampai di dalam cecair. Apabila sel telah dipecahkan, enzim endogenous terbebas akan menghidrolisis kandungan sel secara autolisis. Selain itu, enzim eksogenous ditambah untuk mempercepatkan proses serta menyebabkan pengurangan masa

pemrosesan dan peningkatan hasil pengeluaran. Oleh itu, enzim adalah cara yang efektif untuk memecahkan dinding sel yis. Selain enzim ditambah untuk membantu pencernaan dinding sel, penambahan enzim juga boleh digunakan untuk meningkatkan perisa produk akhir (Anon, 2004a). Di samping itu, kaedah berasaskan enzim yang digunakan untuk penghasilan ekstrak yis adalah menggabungkan kaedah mesra alam, pemecahan dinding sel dan hidrolisis separa makromolekul kepada mikronutrien (Keshavarz *et al.*, 1987). Malah degradasi secara enzimatik juga boleh menghasilkan serpihan sel yang besar yang mana mudah disingkirkan oleh kaedah pengemparan dan penurasan yang juga turut membantu dalam aliran pemrosesan. Di samping itu, kaedah enzimatik adalah sesuai untuk kegunaan proses berskala besar terutamanya untuk yis (Middelberg, 1995).

Selain itu, pemecahan yang membabitkan pengocakan ampai sel mikrob dengan bebuli kaca juga adalah teknik yang sangat efektif. Prosedur ini adalah efisien terutamanya dalam pemecahan yis dan kulat berfilamen yang mempunyai sel tegar yang mana terdiri daripada polisakarida (80-90 %). Tambahan lagi prosedur ini boleh dijalankan secara mod selanjar (Keshavarz *et al.*, 1987). Walaubagaimanapun, pemecahan yang lebih pantas secara amnya dapat dicapai dengan bebuli yang lebih kecil. Oleh itu, diameter bebuli kaca 0.10-0.15 mm adalah dianggap optimum untuk pemecahan bakteria sementara bebuli dengan diameter 0.25-0.75 mm digunakan untuk pemecahan yis (Kula & Shutte, 1987).

Oleh kerana saiz yis yang lebih besar dan struktur dinding sel yang berbeza, maka pemecahan sel yis adalah lebih mudah daripada bakteria. Struktur komponen asas dikenali seperti glukukan, mannan dan protein. Struktur keseluruhan adalah lebih tebal daripada struktur dinding bakteria gram-positif. Manakala glukukan adalah molekul bercabang secara sederhana yang mengandungi residu glukosa, terutamanya dalam ikatan β -(1-3) dan γ -(1-6). Sementara itu, mannan adalah dicirikan oleh tulang belakang residu mannosa dalam ikatan α -(1-6) yang memiliki rantai sisi oligosakarida pendek (Engler, 1985).

Dalam pada itu, keinginan untuk memperbanyakkan lagi bekalan protein di dunia telah memfokuskan sumber protein mikrobial sebagai makanan untuk haiwan dan manusia. Memandangkan sebilangan besar nisbah bagi setiap bakteria atau sel yis mengandungi protein (lebih daripada 72 % untuk sel yang kaya dengan protein), maka sejumlah besar telah ditumbuhkan untuk membekalkan protein sel tunggal (SCP) untuk digunakan dalam pelbagai tujuan. Protein sebagai molekul makro memainkan peranan daripada segi sifat berfungsi dalam makanan dan farmaseutikal serta juga dalam sistem biologi. Oleh itu, permintaan yang meningkat untuk protein sebagai ramuan penting dalam makanan berformula atau farmaseutikal dan campuran industri telah menyebabkan permintaan untuk protein dengan sifat berfungsi yang spesifik dan konsisten. Selain itu, sifat berfungsi protein adalah sifat fizikokimia yang membolehkannya menyumbangkan ciri-ciri yang dikehendaki dalam makanan (Pelegriane dan Gasparetto, 2005).

1.2 Objektif kajian

Di dalam kajian ini, terdapat tiga objektif utama yang ingin dicapai. Objektif-objektif berikut adalah seperti berikut:

1. Pengoptimuman kaedah pengekstrakan yis dengan menggunakan kaedah enzimatik dan mekanikal samada secara individu atau kombinasi.
2. Penentuan dan perbandingan kandungan nutrisi seperti protein, vitamin-B, profail asid amino dan 5'-ribonukleotida ekstrak yis kajian dengan ekstrak yis komersial.
3. Penentuan dan perbandingan sifat berfungsi (seperti warna, keterlarutan, kapasiti pengemulsian, ketumpatan pukal, keterbasahan, kekeruhan, kelikatan dan lain-lain) protein ekstrak yis kajian dengan sumber protein daripada lain sumber.

BAB DUA

Tinjauan literatur

2.1 Nanas

2.1.1 Sisa pertanian nanas dan sumbernya

Nanas (*Ananas cosmosus*) adalah sejenis tanaman tropik yang dipercayai berasal daripada Amerika Selatan. Jumlah pengeluaran nanas adalah meningkat di kawasan tropika dan sebanyak 12.8×10^6 tan nanas dihasilkan di seluruh dunia dalam tahun 1997. Nanas dimakan segar atau diproses (terutamanya untuk pengalengan) tetapi hanya buah yang berkualiti tinggi dipilih untuk pemprosesan atau dieksport. Buah yang mempunyai kualiti rendah akan dibiarkan mereput di dalam ladang kerana kurangnya pasaran (Correia *et al.*, 2004).

Sisa nanas adalah produk sampingan industri pemprosesan nanas dan asasnya mengandungi residu pulpa, kulit dan empulur. Sebahagian besar nanas yang diproses menjadi jus akan meninggalkan sejumlah besar pulpa yang tidak berguna dan menjadi bahan sisa (Correia *et al.*, 2004). Sisa nanas tidak dianggap menarik sebagai makanan haiwan kerana mengandungi karbohidrat terlarut dan protein yang rendah, serta kandungan serat yang tinggi (asas kering) (Correia *et al.*, 2004). Namun begitu, menurut Liang (2006), penggunaan sisa nanas (daripada kilang pengalengan nanas) telah digunakan sebagai makanan haiwan untuk ternakan lembu dan kambing.

2.1.2 Aplikasi sisa nanas di dalam industri

Kenji *et al.* (1999) telah melaporkan bahawa jus daripada nanas terbuang dan sisanya boleh digunakan sebagai substrat berkos rendah untuk penghasilan etanol bio-bahan api oleh *Zymomonas mobilis*. Penukaran sisa pemprosesan buah secara biologi melalui fermentasi keadaan pepejal telah berjaya digunakan untuk menghasilkan produk lebih bernilai. Correia *et al.* (2004) telah mengkaji kebolehan *Rhizopus oligosporus* untuk menghasilkan fenol bebas daripada sisa nanas yang bergabung dengan makanan berasaskan soya yang mana merupakan sumber nitrogen yang sangat berpotensi. Biokonversi sisa nanas bercampur dengan makanan berasaskan soya oleh *R. oligosporus* telah meningkatkan kandungan fenol total sisa tersebut serta membenarkan pengeluaran sebatian yang lebih bernilai daripada sisa pemprosesan. Selain itu, Joseph dan Mahadeviah (1998) turut melaporkan bahawa beberapa produk seperti bomelain, wain, sirap gula, asid sitrik dan makanan haiwan ternakan juga boleh dihasilkan daripada sisa industri pemprosesan jus nanas.

Walaubagaimanapun, sekiranya residu ini tidak digunakan dengan baik seperti dibiarkan terhimpun di ladang agro industri tanpa mempunyai sebarang kepentingan industri dan nilai komersial maka sisa pertanian ini boleh menyebabkan masalah persekitaran yang serius (Correia *et al.*, 2004). Kebiasaannya hasil sampingan kilang pengalengan nanas dibuang ke dalam atau berdekatan dengan sungai. Oleh itu, penggunaan hasil sampingan daripada pertanian dapat membantu untuk mengurangkan masalah pencemaran alam sekitar (Liang, 2006).

2.1.3 Komposisi kimia bagi sisa nanas

Komposisi kimia bagi sisa kulit nanas ditunjukkan di dalam Jadual 2.1. Menurut Napavaran *et al.* (1986), komposisi kimia adalah berbeza bergantung kepada musim, tempat dan kaedah pemprosesannya. Selain itu, sisa perkilangan nanas adalah sumber berpotensi bagi gula, protein, vitamin dan menjadi faktor pertumbuhan yang boleh digunakan sebagai substrat untuk pengeluaran etanol (Chye dan Meng, 1975; Prior *et al.*, 1980; Alain *et al.*, 1987). Dalam pada itu, Kenji *et al.* (1999) melaporkan bahawa sisa pulpa nanas masih mengandungi jumlah sukrosa yang banyak di samping kanji dan hemiselulosa.

Jadual 2.1: Komposisi kimia effluen pengalengan nanas^a (Nigam, 1999).

Komponen kimia	Kepekatan (g/L)
Gula total	82.53 ± 0.78
Gula penurun	39.46 ± 0.60
Glukosa	22.70 ± 0.85
Sukrosa	38.70 ± 1.12
Fruktosa	15.81 ± 0.83
Rafinosa	2.62 ± 0.27
Galaktosa	2.85 ± 0.33
Protein	6.40 ± 0.33
Lemak	1.20 ± 0.17
Nitrogen Kjeldahl	2.32 ± 0.15
Pepejal total	50-60*
Bilangan mikrob	10 ² -10 ⁴ mL ⁻¹ *
pH	4.0 ± 0.08

^aSetiap nilai merujuk kepada min untuk lima eksperimen ± SD (sisihan piawai).

*Dalam kes pepejal total dan bilangan mikrob, SD tidak dianggarkan

2.2 Yis

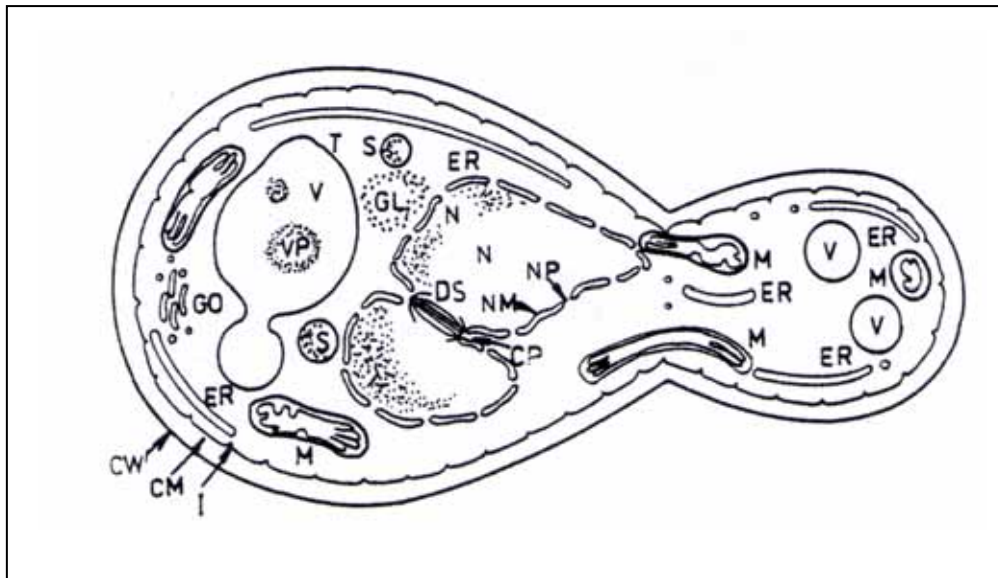
2.2.1 Kejadian dan morfologi yis

Yis adalah kulat mikroskopik, organisma sel tunggal daripada alam tumbuhan yang mana kebiasaannya mempunyai saiz berukuran 5-10 mikrometer (Charlie, 1998). Kebanyakan sel yis mempunyai morfologi yang ringkas samada dalam bentuk bujur atau bentuk rod. Sel yis yang berbentuk bujur adalah seperti *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces carlsbergensis*. Manakala sel yis berbentuk rod adalah seperti yis *Candida* (Parry dan Pawsey, 1984).

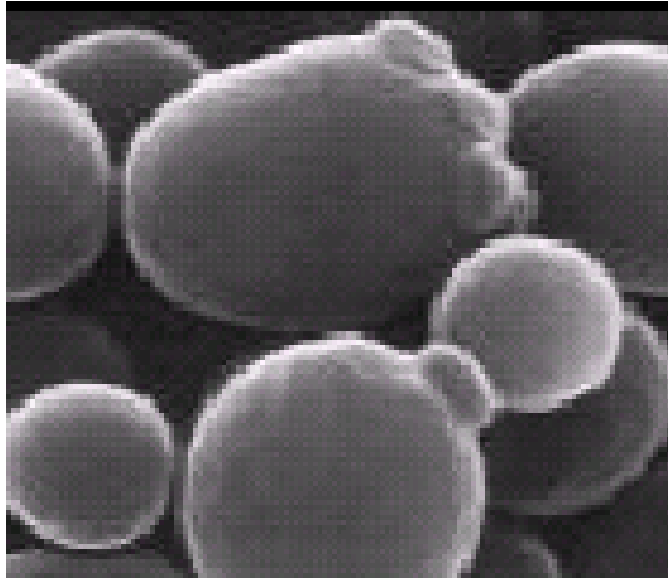
Charlie (1998) menyatakan bahawa spesies-spesies yis adalah berbeza antara satu sama lain, bergantung kepada tempat ditemui, bentuk atau morfologi sel, cara yis tersebut memetabolisasi substrat yang berbeza dan cara pembiakan. Yis banyak terdapat di seluruh persekitaran misalnya yis boleh ditemui di dalam bijian gandum, produk sampingan gandum, silaj, jerami, tanah dan air. Yis adalah anaerob fakultatif iaitu bermaksud boleh hidup dan bertumbuh dengan atau tanpa oksigen. Pembiakan yis adalah satu proses aerobik yang mana yis menukarkan oksigen dan gula kepada karbon dioksida dan tenaga bebas berguna yang mencukupi untuk pertumbuhan sel yis melalui kaedah metabolisme pengoksidaan. Manakala pertumbuhan sel yis bermaksud peningkatan isipadu sel atau saiz. Pertumbuhan kultur yis adalah peningkatan dalam jumlah sel contohnya peningkatan keseluruhan dalam biojisim (Kratochvilova, 1990).

2.2.2 Pembiakan yis

Yis yang bertumbuh dengan baik adalah membiak secara proses pertunasan. Satu bengkak yang kecil akan muncul pada sisi sel induk yang secara perlahan-lahan membesar daripada segi saiz. Pada satu masa dinding sel pada sel induk akan terjerut dan secara progresif akan membentuk sel anak. Apabila sel anak mencapai lebih kurang separuh daripada saiz induk maka proses membentuk sel anak menjadi lengkap dan sel anak dilepaskan. Parut akan tertinggal di atas permukaan sel yang mana sel anak terpisah. Tunas yang baru tidak akan bertumbuh pada tapak parut tersebut. Sesetengah yis boleh membiak secara seksual dengan membabitkan persenyawaan dua sel (Parry dan Pawsey, 1984). Rajah 2.1 menunjukkan skema struktur penunasan sel yis manakala Gambarajah 2.1 menunjukkan contoh penunasan sel yis daripada spesies *Saccharomyces cerevisiae*.



Rajah 2.1: Skema struktur penunasan sel yis (Adaptasi daripada Kratochvilova, 1990). N: nukleus, NP: liang nuklear, NM: membran nuklear, DS: gelendong ('spindle'), CP: plak ('plaque'), ER: retikulum endoplasmik, V: vakuol, VP: pinositosis, T: tonoplas, GO: peralatan Golgi, M: mitokondrion, CW: dinding sel, Gl: globul, CM: plasmalema, I: invaginasi ('invagination')



Gambarajah 2.1: Pertunasan sel yis *Saccharomyces cerevisiae* (Anon, 2005).

2.2.3 Ciri-ciri dinding sel yis

Yis merupakan kulat biasa yang mempunyai struktur subasel asas yang serupa dengan haiwan peringkat tinggi dan sel tumbuhan. Ianya telah digunakan sebagai sistem model untuk pelbagai bidang seperti sains hayat asas dan gunaan, perubatan dan bioteknologi. Walaubagaimanapun, dinding sel merupakan satu-satunya struktur di dalam yis yang tidak terdapat di dalam sel haiwan (Osumi, 1998). Dinding sel yis boleh dibayangkan sebagai satu struktur dinamik, plastik dan mempunyai pelbagai lapisan yang terletak di luar membran plasma. Dinding sel adalah struktur yang bertanggungjawab untuk mengekalkan bentuk yang memberi ciri bagi setiap bentuk pertumbuhan kulat (contohnya yis dan hifa) dan juga bertindak sebagai penghalang ketelapan yang melindungi protoplas daripada kecederaan fizikal dan osmotik (Jose *et al.*, 1998).

Selain itu, dinding sel juga berperanan sebagai nutrisi dan merupakan struktur yang menjadi perantaraan interaksi awal antara mikroorganisma dengan persekitaran (Jose *et al.*, 1998). Dinding sel yis yang terletak di luar membran plasma kelihatan seperti struktur berlapis yang mana lapisan luar yang tumpat elektron ('electron-dense') mengandungi manoprotein manakala lapisan dalam yang telus-elektron ('electron-transparent') adalah mengandungi β -1, 3-glukan dan kitin (Chaffin *et al.*, 1998).

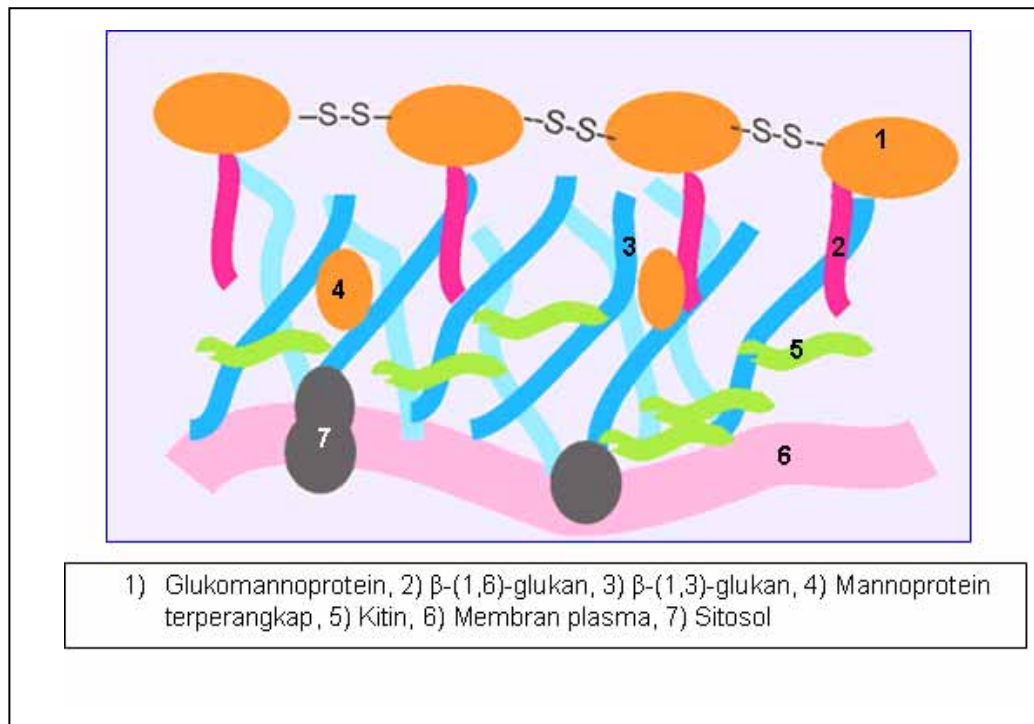
2.2.4 Komposisi, struktur dan fungsi dinding sel *Candida spp.*

Rajah 2.2 menunjukkan ilustrasi komponen dinding sel yis. Komponen utama dinding sel spesies *Candida* adalah karbohidrat (80-90 %) iaitu: a) mannan atau polimer manosa yang terikat secara kovalen dengan protein untuk membentuk glikoprotein atau juga dikenali sebagai mannoprotein, b) β -glukan iaitu polimer bercabang bagi glukosa yang mengandungi ikatan β -1, 3 dan β -1, 6 dan c) kitin iaitu homopolimer tidak bercabang bagi N-asetil-D glukosamina (GlcNAc) yang mengandungi ikatan β -1, 4. Manakala komponen lain seperti protein (6-25 %) dan lipid (1-7 %), masing-masing hanya hadir sebagai unsur-unsur yang minor pada dinding sel.

β -glukan dan kitin adalah komponen struktur bagi dinding sel. Secara kuantitatifnya, β -glukan menyumbang kepada berat kering dinding sel sebanyak 47 hingga 60 %. Manakala kitin adalah minor (0.6 hingga 9 %) tetapi secara strukturnya kitin merupakan komponen penting yang mana struktur khususnya bersatu dengan penghubung sel-sel di dalam gelang antara sel induk dan anak di dalam parut tunas (bud scar) dan di dalam septa bagi sel

yang bebas membahagi. Polimer manosa pula wujud secara penyatuan kovalen dengan protein (mannoprotein) (Calderone dan Braun, 1991; Cassone, 1989; Sentandreu *et al.*, 1991; Shepherd, 1987; Shepherd *et al.*, 1985). Polimer manosa adalah bahan utama matriks dinding sel amorfos di dalam struktur polimer (β -glukan dan kitin) yang tertanam dan ianya mewakili 40 % bagi keseluruhan karbohidrat dinding sel.

Namun begitu walaupun manosa merupakan komponen monosakarida utama bagi dinding sel glikoprotein tetapi terdapat bukti yang menunjukkan residu gula yang lain juga hadir di dalam beberapa dinding spesies glikoprotein. Kajian mikroskop elektron menunjukkan kehadiran beberapa lapisan di dalam dinding sel. Struktur tersebut adalah berbeza-beza dan berkaitan dengan strain yang dikaji, keadaan pertumbuhan, morfologi dan kondisi eksperimen yang digunakan untuk penyediaan spesimen tersebut (Calderone dan Braun, 1991; Cassone, 1989; Poulain *et al.*, 1986).



Rajah 2.2: Ilustrasi komponen dinding sel yis (adaptasi daripada Anon, 2005)

2.2.5 Kegunaan yis *Candida utilis* dalam industri

Secara umum, yis telah digunakan dalam pengeluaran makanan seperti pembuatan bir, wain dan pembuatan roti. Di Korea, hampir 6000 tan sel yis kering dihasilkan daripada tiga pengeluar utama bir pada tahun 1996 (AFLN, 1997). Dewasa ini, kebanyakan sisa industri iaitu sel yis brewer digunakan sebagai sumber protein untuk makanan haiwan dan makanan nutrisi tambahan terutamanya selepas pengeringan kerana paras proteinnya yang tinggi (40 – 60 %). *Candida utilis* telah digunakan dalam industri sejak 70 tahun dahulu untuk penghasilan protein sel tunggal (SCP) untuk makanan manusia dan haiwan, rawatan sisa dan penghasilan bahan kimia yang digunakan sebagai penambahbaik perasa (Peppler dan Perlman, 1979).

Di Jerman, ketika perang dunia ke 2, *Candida utilis* telah ditumbuhkan di atas sisa likuor sulfit dan gula terbitan kayu yang digunakan sebagai makanan tambahan haiwan (Litchfield, 1979; Litchfield, 1983) dan penghasilan SCP menggunakan *Candida utilis* telah diteruskan sehingga ke hari ini. *Candida utilis* boleh menyerap heksosa dan pentosa dan pelbagai asid organik di dalam likuor sisa sulfit. Kebanyakan fermentasi *Candida utilis* dilakukan pada pH rendah iaitu 4 - 4.5 dan suhu pada 32 °C atau lebih tinggi.

Candida utilis telah digunakan dalam proses fermentasi kaedah tunggal atau kaedah yang pelbagai untuk degradasi sisa selulosa. Malah aplikasinya juga termasuklah mengurangkan BOD ('biological oxygen demand') untuk penyulingan silaj dalam pengeluaran molas tebu (Sivarama *et al.*, 1984). Selain itu, yis ini juga terkenal sebagai mikroorganisma yang berpotensi untuk meningkatkan kandungan protein sisa cecair (Lemmel *et al.*, 1979) atau pepejal (Rhamat *et al.*, 1995) pertanian untuk makanan haiwan. Di samping itu, Elmaleh *et al.* (1999) melaporkan bahawa *Candida utilis* juga boleh digunakan untuk merawat sisa industri makanan yang pekat secara pengoksidaan asid organik sisa tersebut.

2.2.6 Produk yis dan kebaikannya

Menurut Lyall (1965), produk yis yang diproses dikategorikan kepada dua kumpulan iaitu ekstrak yis (larutan atau cecair pekat) dan yis kering serbuk. Kedua-dua kumpulan tersebut mempunyai perasa yang kuat dan mempunyai aplikasi yang besar dalam kebanyakan jenis makanan. Kebaikan-kebaikan yis boleh diringkaskan seperti berikut:

- a) Produk semulajadi yang kaya dengan nutrisi. Yis juga merupakan bahan makanan yang diterima pengguna di seluruh dunia. Kandungan lemak dan garam di dalamnya adalah rendah serta yis tidak berbahaya malahan bermanfaat dan mudah dicerna. Ianya berguna untuk pemakanan bayi dan pengamalan diet tertentu. Yis yang diproses juga adalah bebas daripada sebarang bahan berbahaya.
- b) Penstorannya adalah mudah dan kualiti penyimpanannya adalah amat baik. Yis mengandungi antioksidan semulajadi dan jangka hayat bagi makanan yang mengandungi produk yis lebih tahan lama.
- c) Produk yis adalah mudah dikendalikan dan tidak memerlukan pekerja yang banyak dalam pembuatannya.
- d) Produk yis adalah digolongkan sebagai produk berasaskan sayur-sayuran atau tumbuhan serta diterima untuk diet tertentu tanpa mengira latar belakang kesihatan atau agama individu.
- e) Produk yis kaya dengan rasa dan perisa menyebabkan peningkatan jualan dan popular digunakan dalam kebanyakan produk makanan.
- f) Kaya dengan protein, bahan mineral, vitamin-B kompleks menjadikannya produk yang baik untuk kesihatan.
- g) Yis yang diproses adalah murah daripada segi harga. Contohnya, ekstrak yis adalah pengganti yang murah untuk ekstrak daging di dalam produk daging.

2.3 Ekstrak yis

2.3.1 Definisi ekstrak yis

Ekstrak yis (YE) dikategorikan sebagai produk yis yang tidak aktif. Istilah YE kadang kala digunakan sinonim dengan nama autolisat yis (Reed & Peppler, 1973; Prescott & Dun, 1982). Namun begitu, menurut Peppler (1982) istilah yang lebih tepat adalah ekstrak yis autolisat. Walaubagaimanapun, tatanama ekstrak yis berbeza mengikut pihak pengeluar dan penulis itu sendiri namun yang lebih penting adalah daripada segi penjelasan terminologi yang digunakan. Mengikut International Hydrolyzed Protein Council, autolisat ekstrak yis adalah ramuan makanan yang digunakan sebagai ramuan makanan semulajadi di seluruh dunia. Ekstrak ini mengandungi asid amino, peptida dan polipeptida hasil daripada pecahan ikatan peptida secara enzimatik di dalam yis yang boleh dimakan. Selain itu terdapat juga komponen larut air bagi sel yis.

2.3.2 Sumber ekstrak yis

Di Eropah, bahan mentah utama bagi YE adalah yis berprotein tinggi prima (contohnya daripada strain *Saccharomyces cerevisiae*) yang mana yis tersebut bertumbuh di atas media berasaskan molas. Manakala di Amerika Syarikat dan United Kingdom, YE dihasilkan daripada yis brewer yang ternyahpahit (strain *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces uvarum*). Selain itu, bahan mentah yang lain yang digunakan adalah yis seperti *Kluyveromyces fragilis* (difermentasi di atas wei), atau *Candida utilis* (ditumbuhkan di atas etanol atau sisa berkarbohidrat tinggi seperti produk daripada industri pembalakan)(Sommer, 1996).

Kebanyakan makanan berasaskan yis menggunakan strain *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces carlsbergensis* kerana kajian menunjukkan keputusan yang memuaskan untuk ketiga-tiga strain tersebut. Namun begitu, *Candida utilis* merupakan strain yis yang lebih digemari kerana mempunyai saiz sel yang besar dan dapat membiak dengan cepat di bawah keadaan aerobik serta menggunakan ammonia dengan efisien untuk mensintesis kesemua asid amino perlu. Selain itu, *Candida utilis* juga menggunakan pelbagai jenis monosakarida dan disakarida berbanding spesies-spesies lain dan ini bermakna hasil yis per berat karbohidrat *Candida utilis* adalah yang tertinggi antara ketiga-tiga jenis yis yang diterima tersebut (Maltz, 1981).

Di samping itu, strain *Candida utilis* juga merupakan pengeluar vitamin larut air yang paling tinggi namun begitu *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces carlsbergensis* tetap menghasilkan amaun vitamin larut air yang mencukupi. Menurut Maltz (1981) *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sachharomyces fragilis* dan *Sachharomyces carlsbergensis* diminati sebagai bahan permula (starting material) kerana masing-masing secara umumnya dikenali sebagai selamat (GRAS) oleh FDA untuk kegunaan dalam produk makanan.

2.3.3 Aplikasi ekstrak yis di dalam industri

Pada gred yang bersesuaian, produk yis boleh digunakan sebagai ramuan untuk meningkatkan nilai nutrisi dan sebagai 'fillers' dan 'bulkiers' atau sebagai ramuan perisa dan pengkayaan bagi perasa semulajadi. YE telah

digunakan sebagai agen perasa di dalam sup, sos, gravi, 'stew', makanan ringan dan makanan bertin. Kegunaan lain termasuklah vitamin tambahan dalam makanan kesihatan dan juga sebagai sumber nutrien di dalam medium mikrobiologi (York dan Ingram, 1996).

YE mengandungi 5'-IMP yang mempunyai kepentingan untuk meningkatkan ciri-ciri peningkat rasa. Makanan yang kaya dengan 5'-IMP dan 5'-GMP (dengan nisbah ribonukleotida 1:1), rasa manis dan masin hanya meningkat sedikit manakala rasa pahit dan masam akan tertindan. Secara ringkasnya, kesan peningkatan rasa oleh 5'-GMP, 5'-IMP dan asid glutamik adalah rangsangan berterusan reseptor pada tunas rasa yang membentuk potensi sensori untuk perasa yang baik. Di samping itu, autolisat yis dan YE digunakan terutamanya sebagai penambahbaik perisa serta juga bertindak sebagai peningkat rasa atau sebagai perasa tulen. Selain itu, autolisat yis juga boleh menyembunyikan rasa pahit dan masam, meningkatkan aroma dan bertindak sebagai agen perwarna atau antioksidan (York dan Ingram, 1996). Dalam pada itu, YE merupakan sumber bagi pelbagai prekursor perisa daging selain daripada mengandungi asid amino, peptida, gula, nukleotida, lipid, dan vitamin-B (Hough dan Maddox, 1970; Gousens, 1974; Cogman dan Sarant, 1977) .

Penambahbaik perisa adalah satu kumpulan sebatian kimia yang bertindak sebagai peningkat ciri-ciri rasa. Sebatian ini tidak mempunyai rasa yang signifikan atau langsung tidak mempunyai rasa. Selain itu, sebatian ini juga meningkatkan rasa bahan-bahan lain dengan mengubahsuai atau

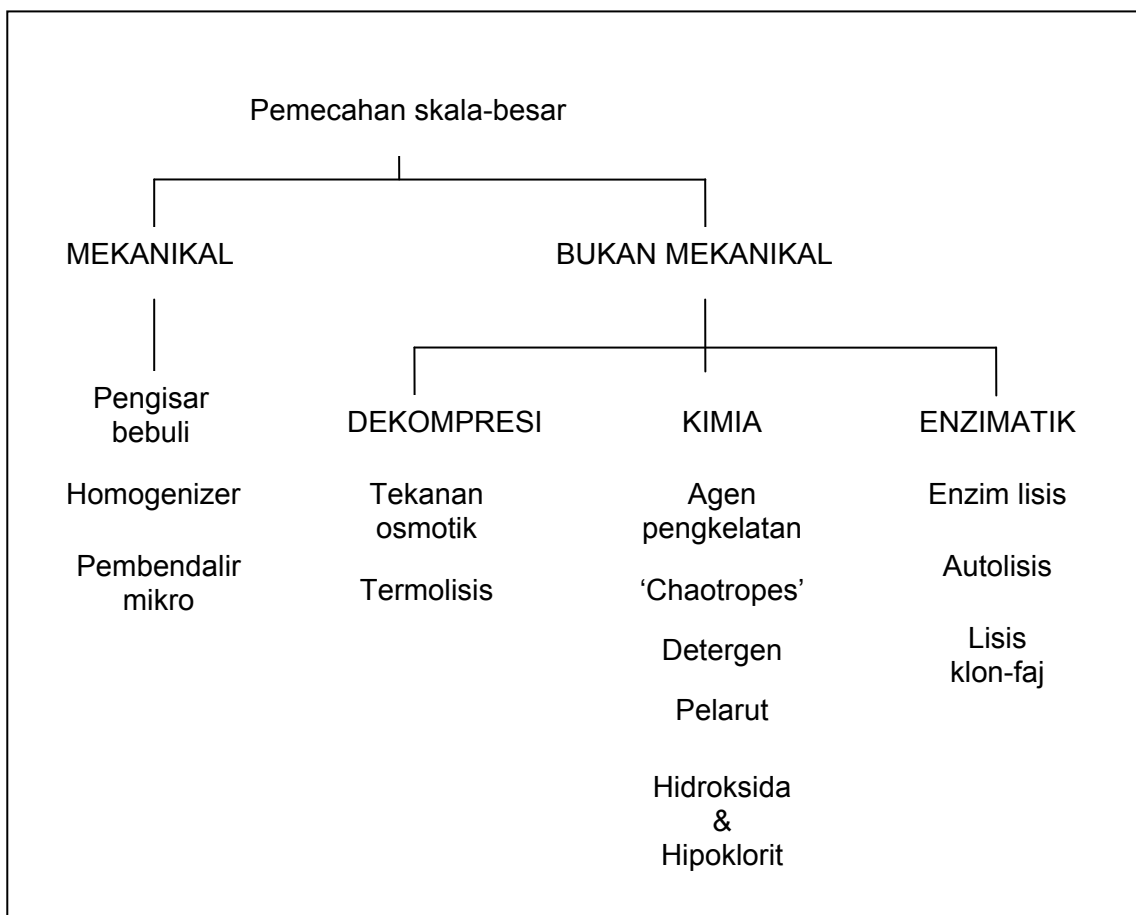
menyusut keamatan rasa bahan tersebut dan menyembunyi sebarang rasa yang berlebihan (Nagodawithana, 1992; Rutkowski *et al.*, 1997).

Penambahbaik perisa telah diletakkan dibawah senarai GRAS ('Generally Recognize as Safe') dan disahkan oleh FDA ('Food and Drug Administration') sebagai aditif makanan yang selamat serta tidak termasuk dalam kategori yang terhad dos harian, ADI ('Admissible daily intake'). Kehadiran 5' nukleotida dengan ekstrak yis menjadi aditif asas dalam makanan segera yang mana kedua-dua bahan-bahan tersebut mudah untuk disediakan. Dua penguat yang sering digunakan dalam pembuatan makanan adalah disodium 5'- inosinat dan disodium 5'-guanilat yang bergabung dengan monosodium glutamat (MSG) untuk membangunkan rasa 'umami' iaitu rasa asas kelima selain daripada pahit, manis, masam dan masin (Conn, 1992).

Selain itu, YE dan autolisat tidak hanya meningkatkan profail perisa makanan tetapi juga berpotensi untuk mengurangkan ekstrak daging yang mahal (Peppler, 1982; Dziezak, 1978). Dalam bentuk serbuk YE adalah lebih efektif dalam penyediaan perisa 'savoury'. Ia juga boleh digunakan sebagai ramuan tambahan untuk meningkatkan perisa 'savoury' bagi keju, ham, bawang, rempah dan sebagainya (Lyll, 1965). Ciri utama bagi YE adalah mempunyai keterlarutan yang sempurna dalam pemprosesan sesetengah makanan seperti yis kering brewer yang tahan dalam pemprosesan haba tinggi. Oleh kerana YE mempunyai perasa yang kuat dan mudah larut maka hanya nisbah yang kecil sahaja diperlukan untuk memberi perbezaan rasa dalam sesuatu produk akhir.

2.4 Kaedah pemecahan sel yis

Rajah 2.3 menunjukkan teknik-teknik yang boleh digunakan untuk pemecahan mikroorganisma pada skala besar. Manakala kaedah pemecahan yang sering dipraktikkan dalam penghasilan ekstrak yis samada secara skala kecil atau besar adalah seperti berikut:



Rajah 2.3: Teknik-teknik yang sesuai untuk pemecahan mikroorganisma pada skala besar (Adaptasi daripada Middelberg, 1995).

2.4.1 Autolisis

Autolisis adalah pemecahan sel atau tisu akibat tindakan enzim autogen yang dihasilkan oleh sel atau tisu itu sendiri (Baharuddin dan Ibrahim, 1999). Kaedah ini boleh tercapai dengan mengawal rapi faktor-faktor seperti suhu, pH,

masa dan penambahan sesetengah enzim atau agen-agen tertentu untuk merangsang proses degradasi. Sugimoto (1974) melaporkan bahawa penggunaan 1-9 % etanol (i/i) yang dicampur dengan 2-10 % (b/i) NaCl terhadap yis telah membantu meningkatkan kadar autolisis. Pada sesetengah keadaan autolisis boleh menyebabkan kematian sel tanpa perlu menyahaktifkan enzim hidrolitik yang secara umumnya terdapat di dalam sel yang sihat (Nagodawithana, 1992).

Menurut Middelberg (1995), autolisis dikelaskan sebagai kaedah enzimatik walaupun kaedah ini sering kali menggunakan pengaruh bahan kimia dan tekanan atau kejutan fizikal. Faktor ini adalah disebabkan oleh enzim endogenous yang mendegradasi dinding daripada dalam dan dengan ini menjadi agen penyebab pemecahan. Autolisis telah digunakan untuk menyediakan autolisat yis dan hidrolisat yis untuk beberapa dekad (Hopkins, 1991; Reed dan Nagodawithana, 1991). Autolisis sel yis hidup berlaku adalah pada pH 5.5 pada suhu 45-50 °C selama 24-36 jam. Ini adalah akibat tindakan β -1,3-glukanase dan protease di dalam sel tersebut.

Namun begitu, proses autolisis mempunyai beberapa keburukan daripada segi hasil pengekstrakan yang rendah, pemisahan pepejal-cecair yang sukar disebabkan oleh kandungan residu yang tinggi di dalam autolisat, sifat sebagai peningkat rasa yang lemah dan risiko kemerosotan kerana faktor kontaminasi mikrob (Reed dan Nagodawithana, 1991).

Suraiami (2003), telah mengaplikasi kaedah autolisis untuk memecahkan yis yang mana dalam kajian tersebut sebanyak 5 % yis *Candida utilis* dilarutkan di dalam air suling dan dieram selama 48 jam di dalam inkubator goncangan dengan kelajuan 100 psm pada suhu eraman yang pelbagai (30-70 °C). Keputusan mempamerkan suhu 50 °C telah menyebabkan pemelarutan biojisim sel, penghasilan kepekatan protein dan aktiviti enzim protease yang tertinggi berbanding suhu-suhu yang lain.

2.4.2 Plasmolisis

Dalam pembuatan YE, plasmolisis merupakan kaedah yang diterima secara meluas di Eropah tetapi tidak di Amerika Syarikat. Bahan kimia yang biasanya digunakan dalam proses ini ialah garam NaCl. Pada kepekatan garam yang tinggi, sel yis akan mula kehilangan air dan sitoplasma cenderung untuk berpisah daripada dinding sel dan keadaan ini dikenali sebagai plasmolisis. Kaedah plasmolisis berlaku dalam kadar masa yang lama dan menyebabkan sel mati serta faktor ini membolehkan berlakunya proses degradasi.

Walaupun bagaimanapun, kaedah ini digemari dalam pembuatan YE kerana kaedahnya ringkas dan tidak memerlukan peralatan yang khusus. Hal ini kerana garam adalah murah, senang didapati dan dianggap sebagai agen bakterisidal yang baik. Namun begitu, ekstrak ini mempunyai kegunaan yang terhad pada masa depan kerana masyarakat menuntut kepada sumber makanan yang rendah kandungan garam (Nagodawithana, 1992).